

**UNTERSUCHUNGEN ZUR VERERBUNG DER
PI-M UNTERGRUPPEN -
EIN BEITRAG ZUR GENETIK DES
ALPHA-1-ANTITRYPSINS.**

**vorgelegt von
Katharina Strecker**

1982

Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik
der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Hartwig Cleve

UNTERSUCHUNGEN ZUR VERERBUNG DER PI-M UNTERGRUPPEN -
EIN BEITRAG ZUR GENETIK DES ALPHA-1-ANTITRYPSINS.

von der

Fakultät für Medizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

Vorgelegt von Katharina S t r e c k e r

geboren in Fürstenfeldbruck

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hartwig Cleve

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heinz Spiess

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1982



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Untersuchungsmaterial	9
Methode	11
Prinzip der Isoelektrofokussierung	
pH-Gradient	
Trägermaterial	
Herstellung der Gele	
Auftragen der Proben	
Fokussierung	
Fixierung und Färbung	
Konservierung	
Ergebnisse	15
Klassifizierung der Pi M-Untergruppen	
Schwierigkeiten bei der Klassifizierung	
Änderung einiger methodischer Faktoren	
Polymerisation der Gele	
Lagerung der fertig gegossenen Gele	
Temperaturänderung während der Fokussierung	
Veränderung der Dauer der Fokussierung	
Die Vererbung der Pi M-Untergruppen	
Diskussion	26
Vergleich der vorliegenden Werte mit bisherigen	
Untersuchungen anderer Autoren	
Möglichkeit für die Verwendung des Pi-Systems in	
der Vaterschaftsdiagnostik	
Bedeutung der einzelnen Pi M-Untergruppen für die	
klinische Genetik	
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33
Lebenslauf	41

Einleitung

Camus und Gley beschrieben bereits im Jahre 1897 die Fähigkeit des menschlichen Serums, Proteasen zu hemmen. Durch die technische Weiterentwicklung der Elektrophorese gelang es jedoch erst im letzten Jahrzehnt sechs Proteine zu identifizieren, welche diese Fähigkeit besitzen.

Der am besten erforschte, wohl auch der bedeutenste Protease-Inhibitor des menschlichen Serums ist Alpha-1-Antitrypsin = AT. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der menschlichen Serumproteine bildet es den größten Anteil der α_1 -Globulin Fraktion. AT besitzt die höchste molare Konzentration von allen Inhibitoren, 2,0 - 2,5 g/l, und ist für nahezu 90 % der gesamten Trypsin-Hemmung im menschlichen Serum verantwortlich. Außer Trypsin werden noch eine Reihe anderer Enzyme gehemmt, wie Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Elastase, Thrombin u.s.w.

1955 wurde AT zum ersten Mal aus dem menschlichen Serum isoliert (51). Es besitzt ein Molekulargewicht von 54000; biochemisch handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 12,4 %, zusammengesetzt aus Galaktose, Mannose, Fukose, Acetylhexosamin, sowie Acetyl-Neuraminsäure. Die prozentuelle Zusammensetzung des Proteinanteils aus den verschiedenen Aminosäuren ist ebenfalls bekannt. Relativ hohe Konzentrationen zeigen Asparaginsäure (9,75 %), Glutaminsäure (12,9 %) und Leucin (9,9 %), während Cystein nicht gefunden wurde. Diese Zahlen variieren bei den verschiedenen Autoren. Partielle Aminosäuresequenzen sind bereits erforscht, auch die Lage des aktiven Zentrums zwischen zwei Disulfid-Brücken ist bekannt.

Jedoch ist die Struktur des gesamten Moleküls noch nicht aufgeklärt (24, 27, 33).

AT wird in der Leber synthetisiert und kommt in allen Körperflüssigkeiten vor. Der physiologische Wirkungsmechanismus ist nicht genau bekannt. Man vermutet ein Zusammenspiel mit einer Vielzahl von Enzymen, möglicherweise durch Abspaltung eines Peptidfragmentes. Seine Hauptbedeutung liegt wahrscheinlich in der Hemmung der bei Entzündung von Leukozyten freigegebenen proteolytischen Enzyme, insbesondere der Elastase der Granulozyten und Makrophagen. Außer bei Entzündungen wurden Anstiege der AT-Konzentration im Serum während der Schwangerschaft, nach Typhusimpfung und nach Östrogengabe gefunden (21, 33, 43, 48).

1963 beschrieben Laurell und Eriksson einen AT-Mangel bei jungen Patienten mit Lungenemphysem (37). 1965 zeigte Eriksson in einer Studie mit 8000 Probanden, daß Personen mit AT-Mangel ein erhöhtes Risiko haben, an Lungenemphysem zu erkranken gegenüber einer Gruppe mit normalem AT-Spiegel (11). Außerdem wurden zahlreiche erbliche Strukturvarianten des AT's gefunden. Bis jetzt sind insgesamt 23 verschiedene genetische Typen bekannt (17). An der Aufklärung dieses genetischen Polymorphismus arbeiten Biochemiker, Genetiker, Immunologen und Pulmologen.

Die Typisierung erfolgt mittels Stärke-Gel-Elektrophorese in saurem Milieu, zweidimensionaler Immunelektrophorese oder Stärke-Gel-Elektrophorese kombiniert mit Immunofixation (14, 15, 40).

AT erweist sich bei der elektrophoretischen Untersuchung als

heterogen. Im alkalischen Milieu zeigt die Auftrennung eine große und kleine Komponente, während unter sauren Bedingungen 8 Banden von unterschiedlicher Intensität beobachtet werden (14). Die strukturelle Basis der elektrophoretischen Heterogenität ist noch nicht eindeutig geklärt.

Die beim Vergleich zahlreicher Serumproben zu beobachtenden unterschiedlichen Typen von AT sind genetisch determiniert. Das System wird Pi-System genannt, Pi = protease inhibitor. Es handelt sich um einen autosomalen Genort. Die verschiedenen Typen werden durch zahlreiche kodominant vererbte Allele bestimmt. Die einzelnen Allele werden mit Buchstaben bezeichnet. Die Position der Buchstaben im Alphabet gibt ungefähr die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Varianten wieder im Vergleich zu Pi M, dem am weitesten verbreiteten Pi Typ. So wandert Pi F schneller - weiter anodal - als Pi M, Pi S langsamer als Pi M und Pi Z am langsamsten (13, 18). Die ungefähre Genfrequenz in Nord- und Mitteleuropa beträgt für Pi^M 0,95, gefolgt von Pi^S zwischen 0,02 und 0,04, Pi^F und Pi^Z beide jeweils 0,01 und 0,02. Die Häufigkeit der übrigen Allele liegt unter 0,01 (12).

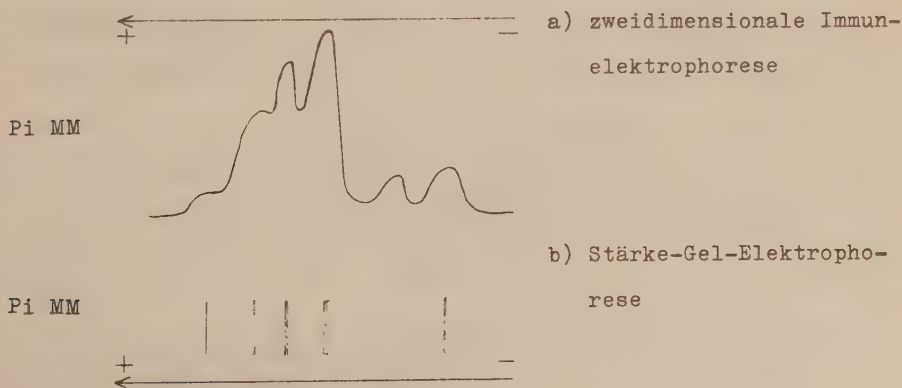


Abb. 1 zeigt die schematische Darstellung der elektrophoretischen Heterogenität bei ein- und zweidimensionaler Auftrennung von AT.

Zwei Allele, Pi^Z und Pi^S , verursachen niedrige Konzentrationen von AT im Serum. Die ungefähren Serumkonzentrationen der verschiedenen Phänotypen sind : ZZ 15 %, MZ 50-60 %, SS 60 %, MS 80 %, die Konzentration des MM Phänotypen mit einem durchschnittlichen Wert von 212 mg/100 ml gelten als 100 % (33). Homozygotie für das Pi^Z Allel bedeutet eine statistisch wesentlich erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit für eine chronisch obstruktive bronchopulmonale Erkrankung. Es entwickelt sich bei den Betroffenen bereits im vierten Jahrzehnt ein schweres Lungenemphysem, während bei anderen Patienten ein Emphysem erst im späteren Lebensalter auftritt. Inwieweit davon nur die Homozygoten Pi ZZ betroffen sind und nicht auch die Heterozygoten Pi MZ, ist bis jetzt noch nicht klar. Womöglich ist für die Heterozygoten Pi MZ das Z Allel für die Entstehung eines Lungenemphysems ein Risikofaktor wie zum Beispiel das Rauchen. Träger des homozygoten Typs Pi SS sowie des heterozygoten Typs Pi MS haben kein erhöhtes Risiko, an Lungenemphysem zu erkranken (46).

Im Zusammenhang mit AT-Mangel wurden 1969 von Sharp auch Lebererkrankungen gefunden. Dabei handelt es sich um frühkindliche Hepatopathien. Häufig bestand eine kongenitale Hepatitis mit Progression zu einer frühkindlichen Zirrhose der Leber. Histologisch erwiesen sie sich als gewöhnliche Leberzirrhosen (26, 49, 52).

Auffällig waren bei Patienten mit AT-Mangel Granula in den He-

patozyten. Diese Granula verhalten sich bei histochemischer Untersuchung PAS-positiv, das heißt, sie enthalten Glykoprotein, welches mit Hilfe von Immunofluoreszenz als AT identifiziert werden kann. Offensichtlich ist bei diesen Individuen die Ausschleusung des AT aus der Leberzelle gestört (26). Welche Rolle jedoch die Akkumulation von AT in den Leberzellen für die Entstehung der kindlichen Leberzirrhosen spielt, ist noch nicht ganz klar.

1973 fand Talamo bei einem 24-jährigen Mann mit Lungenemphysem ein völliges Fehlen von AT im Serum, Pi^{--} , während die Familienmitglieder im Serum 50 % der Konzentration von $Pi M$ enthielten, $Pi M^{-}$ (5, 44, 45). In den Leberzellen fanden sich keine PAS-positiven Granula. Es wird angenommen, daß es sich bei dieser genetischen Variante um einen primären Defekt der Synthese von AT handelt.

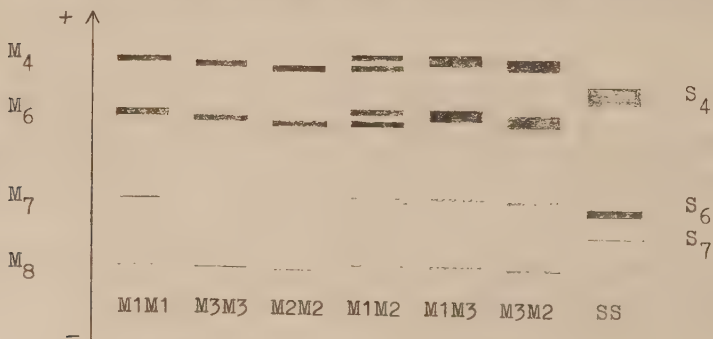
Cox beschrieb 1976 eine neue Variante $Pi M_{Malton}$, welche mit einem noch niedrigeren AT-Spiegel als $Pi Z$ einhergeht und eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese aufweist wie $Pi M$. Das neue Allel wurde bisher nur in einer Familie gefunden. Alle Betroffenen waren gesund, obwohl die Serumkonzentration nur 11-13 % betrug. Sie waren allerdings noch nicht in dem für Lungenemphysem typischen Erkrankungsalter (9).

Im gleichen Jahr fand Liebermann in der Familie einer Patientin mit schwerem AT-Mangel und Lungenemphysem die Variante $Pi M_{Duarte}$, welche in ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit $Pi M$ ähnelt. Die Konzentration ist etwa gleich der von $Pi Z$, auch wurden in der Leber, wie bei $Pi Z$, PAS-positive Granula gefunden. Womöglich handelt es sich bei $Pi M_{Duarte}$ um die-

selbe AT-Variante (41).

Seit einiger Zeit wird zur Klassifizierung der Pi-Typen die Isoelektrofokussierung verwendet (1, 2, 34, 39). Die technische Durchführung ist einfacher als bei der herkömmliche Stärke-Gel-Elektrophorese und die Laufzeit der Gele ist kürzer. Die bessere Trennschärfe erlaubt eine Unterteilung des bis jetzt Pi^M genannten Allels in mehrere Suballele (22, 25).

1976 beschrieben verschiedene Autoren zwei Pi M-Untergruppen und somit drei unterschiedliche Phänotypen. Sie wurden M_1 und M_2 oder M und M_1 genannt (25, 35). Ein Jahr später fanden Genz et al. drei Untergruppen Ma, Mb und Mc (22). Diese unterschieden sich durch geringfügig verschiedene Werte des isoelektrischen Punktes. Durch genetische Kombination entstehen weitere drei heterozygote Formen Mab, Mbc und Mac. So ergeben sich sechs unterschiedliche Phänotypen. Im Juli 1978 wurde in Rouen, Frankreich, durch eine Pi-Arbeitsgemeinschaft eine einheitliche Nomenklatur der sechs Pi M-Untergruppen festgelegt (28). Der weiter anodal liegende Ein-Banden Typ heißt jetzt Pi M1, bisher Pi M und Pi Ma; der kathodal gelegene Ein-Banden Typ Pi M2, bisher Pi M_N , Pi N, Pi Mc; der dazwischenliegende Ein-Banden Typ Pi M3, statt bisher Pi Mb. Dementsprechend werden die heterozygoten Untergruppen Pi M1M3, Pi M2M3, Pi M1M2 genannt.



Die schematische Darstellung in Abbildung 2 zeigt die Lage der verschiedenen Banden der Pi M-Untergruppen untereinander und im Vergleich zu Pi S. Die Banden der Homozygoten M1, M2, M3 sind relativ schmal und klar abgrenzbar. M1M2 tritt durch sein Doppelbandenmuster deutlich hervor. Die Banden der Heterozygoten M1M3 und M3M2 sind wesentlich breiter und nicht so klar abgrenzbar.

1976 befaßte sich Küppers mit der Vererbung der zwei Suballele M und M₁ (alte Nomenklatur). Er untersuchte die Eltern von fünf Kindern mit dem Phänotypen MM₁, der das Doppelbandenmuster zeigt. Er fand beide Allele entweder homozygot oder heterozygot bei den Eltern wieder (35). 1978 untersuchten Frants und Eriksson bei drei Generationen in vier Familien die sechs Pi-Phänotypen und fanden keine Abweichung vom geforderten kodominanten Erbgang (19).

Um die Hypothese zu bestätigen, daß die sechs Pi M-Untergruppen durch drei Allele Pi^{M1}, Pi^{M2} und Pi^{M3} codiert werden und sich zueinander und gegenüber den bisher bekannten Allelen kodominant verhalten, wurde eine umfassende Familienstudie durchgeführt. Durch Isoelektrofokussierung wurde bei 145 Mutter-Kind Paaren und 148 Familien mit insgesamt 239 Kindern die Verteilung der Pi-Untergruppen bestimmt.

Bei der technischen Ausführung der Isoelektrofokussierung wurden von der Herstellung der Gele bis zur Dauer der Fokussierung verschiedene Schritte geändert, um eine optimale Auftrennung der Seren zu erreichen.

Daneben wurden Überlegungen angestellt, ob es sinnvoll ist, das Pi-System in die Vaterschaftsdiagnostik miteinzubeziehen.

Untersuchungsmaterial

Seren von 58 Familien mit 69 Kindern, sowie 145 Mutter-Kind Paaren wurden von Prof. Dr. Dr. Schwarzfischer, Institut für Anthropologie der Universität München, zur Verfügung gestellt. Die Seren waren zur Vaterschaftsbegutachtung verwendet worden, die Lagerung erfolgte bei -20° C. Als Familien wurden solche Fälle angesehen, bei denen in 50 Fällen die Vaterschaft "praktisch erwiesen", in 8 Fällen "höchstwahrscheinlich" war. Die Vaterschaftswahrscheinlichkeit wurde nach Essen-Möller berechnet (Übersicht: 50). Dabei werden eine Vielzahl von genetisch determinierten Merkmalen im Blut bestimmt: Erythrozytenmerkmale, wie die Blutgruppensysteme ABO und MNs, der Komplex der Rhesusfaktoren, sowie die Merkmale Kell, Duffy und Kidd; die erblichen Systeme der Serumproteine wie Haptoglobin, gruppenspezifische Komponenten = Gc, die Gammaglobulingruppen Gm und Inv; die erblichen Unterschiede bei Enzymen wie Adenylatkinase, 6-Phosphoglukonat-Transferase, Adenosindesaminase, Phosphoglukomutase, saure Phosphatase, sowie die Transplantationsantigene des HLA-Systems.

Anhand der Häufigkeitsverteilung in der Normalbevölkerung wurden für die einzelnen Parameter Statistiken erarbeitet, aus denen man prozentual die Vaterschaftswahrscheinlichkeit entnehmen kann. Findet man bei keiner der Untersuchungen einen Ausschluß, so werden alle Daten in einer mathematischen Formel zusammengefaßt, deren Ergebnis einen Hinweis auf die Vaterschaftswahrscheinlichkeit gibt. So bedeuten zum Beispiel Werte von 99,5 - 99,7 %, daß die Vaterschaft "höchstwahrscheinlich" ist, bei Werten über 99,75 % gilt die Vaterschaft als

"praktisch erwiesen" (50).

Außerdem wurden die Ergebnisse einer Familienuntersuchung zur Vererbung der Pi M-Untergruppen zur Auswertung zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um die Ergebnisse der Pi Klassifizierung bei 73 Familien mit insgesamt 132 Kindern (7). Die Serien waren von Prof. Dr. G. G. Wendt, Universität Marburg, in der Marburger Gegend gesammelt worden.

Methode

Prinzip der Isoelektrofokussierung

Amphotere Substanzen, wie Proteine, werden in einem Gel getrennt, über das sich sowohl ein pH-Gradient, als auch ein Spannungsgradient erstreckt. Jedes Proteinmolekül wandert bis zu jener Region im Gel, in der der pH-Gradient seinem isoelektrischen Punkt entspricht, und wird dort festgehalten = fokussiert.

pH-Gradient

Um einen linearen und stabilen pH-Gradienten zu erhalten, benötigt man Trägerampholyte. Verfügbar sind heute Ampholine der Firma LKB, Servalyt von der Firma Serva und Pharmalyt von der Firma Pharmacia. Bei vorliegender Untersuchung wurde Ampholine[®] pH 3,5 - 5,0 der Firma LKB verwendet. Die synthetischen Trägerampholyte bestehen aus vielen aliphatischen Polyamino-polycarbonsäuren (Molekulargewicht = 1000) mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 2,5 und 11. Die höchstgeladenen Ampholyte wandern im elektrischen Feld am schnellsten, verlieren nach und nach ihre Ladung, und bleiben schließlich an dem Punkt stehen, an dem sie keine Ladungsdifferenz gegenüber ihrer Umgebung besitzen. Durch ihre hohe Pufferkapazität am isoelektrischen Punkt sind sie für den pH-Wert des umgebenden Gels verantwortlich. Das Auflösungsvermögen der Elektrofokussierung liegt bei einer pI-Differenz von 0,02 pH-Einheiten. Nach Einschalten des Stroms ist unter optimalen Bedingungen der pH-Gradient nach etwa einer Stunde ausgebildet.

Trägermaterial

Als stabilisierende Trennschicht für analytische Untersuchungen eignen sich Polyacrylamid-Gele am besten, da sie in geringer Polyacrylamid-Konzentration eine ausreichende Porengröße haben und die Stabilität des pH-Gradienten nicht beeinflussen. Die Porengröße wird durch den Vernetzungsgrad bestimmt, welcher von dem Verhältnis der Konzentrationen von Acrylamid und Bis-acrylamid abhängig ist.

Herstellung der Gele

Nach Auflösen von 4 g Saccharose (Merck) in 20 ml aqua bidest. wurden je 5 ml Acrylamid (29,1 g/100 ml aqua bidest.; Serva), Bis-acrylamid (0,9 g/100 ml aqua bidest.; Serva), 1 ml Ampholine[®] pH 3,5 - 5,0 (LKB), 0,1 ml Riboflavin (Merck) und 0,8 ml einer 1 %igen Ammoniumpersulfatlösung (Merck) zugestzt. Die Lösung wurde zwei Minuten im Vakuum entgast und mit einer Spritze zwischen zwei durch einen Gummistreifen getrennte Glasplatten (12 x 26 cm²) eingefüllt. Unter UV-Bestrahlung war die Polymerisation nach 30 Minuten abgeschlossen. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Gele mindestens 30 Minuten bei +4° C gekühlt.

Auftragen der Proben

Eine Glasplatte wurde abgehoben, das 1 mm dicke Gel blieb auf der Unterplatte luftblasenfrei haften. Filterpapierstücke von 5,0 x 5,0 mm² (Schleicher und Schüll 2043 a) wurden mit Serum getränkt, wobei etwa 5 µl benötigt wurden, und 1,0 cm von

der Kathode entfernt auf das Gel gelegt. Die einzelnen Proben hatten einen 1 mm weiten Abstand voneinander, so daß pro Lauf etwa 40 Seren untersucht werden konnten. An der Kathode vermittelte ein in 1 m Glycin-Lösung getränkter 3 mm dicker Filterpapierstreifen, an der Anode ein in 1 m H_3PO_4 Lösung getränkter Streifen den Kontakt zwischen dem Gel und den Platinelektroden. Die Glycin-Lösung wurde jeden Tag frisch angesetzt.

Fokussierung

Die Isoelektrofokussierung wurde in einem Multiphor^R-Gerät (LKB) mit einem Stromversorgungsgerät (LKB 21117) durchgeführt. Bei anfänglich konstanter Stromstärke von 25 mA stieg die Spannung innerhalb der ersten 20 Minuten von 200 - 250 Volt auf über 1000 Volt an. Bis zum Ende der Laufzeit nach drei Stunden blieb die Spannung konstant, während nach etwa einer Stunde die Stromstärke auf 10 mA abgesunken war. Während der gesamten Laufzeit wurden die Gele, welche auf einer Kühlplatte lagen, mittels einer Wassermilchpumpe konstant auf $+11^{\circ}\text{C}$ gekühlt.

Fixierung und Färbung

Die Gele wurden 30 Minuten lang fixiert in einer Lösung aus Trichloressigsäure, Methanol und aqua bidest. (1:2:20, V/V/V) und etwa 12 Stunden in einer Lösung von 0,3 g Coomassie Brilliant Blau in 600 ml Entfärber (500 ml Äthanol, 160 ml Eisessig, 2000 ml aqua bidest.) gefärbt. Anschließend wurden die Gele im Entfärber 8 - 12 Stunden entfärbt.

Konservierung

Die während zwei Stunden in 5 %iger Glycerinlösung von der Glasplatte gelöst und geschmeidig gemachten Gele wurden zwischen zwei angefeuchteten Cellophan-Blättern über Nacht bei 50° C getrocknet. Man erhielt so eine dünne, durchsichtige und haltbare Folie.

Ergebnisse

Klassifizierung der Pi-Untergruppen

Das Ablesen der feuchten Gele erfolgte mit einer Lupe auf einer von unten beleuchteten Milchglasscheibe. Auf jedem Gel wurde nach 10 Seren ein Standard M1M2 aufgetragen, um einen Anhalt für die Trennschärfe und somit für die Verwertbarkeit des Gels zu haben. So konnten alle Seren des Typs M1M2 aufgrund des typischen Doppelbandenmusters nach dem ersten Lauf bereits eindeutig klassifiziert werden. Nach dem Verfahren von Küppers (34) wurden die fraglichen homozygoten Seren M1 mit dem Standard M2, die fraglichen homozygoten Seren M2 mit dem Standard M1 im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Aufgrund des Doppelbandenmusters M1M2 konnten die jeweiligen homozygoten Typen dann beim zweiten Lauf klassifiziert werden. Bei Seren, welche weder mit M1 noch mit M2 eine Doppelbande ergaben, konnte es sich entweder um den Typ M3 handeln, oder um einen der heterozygoten Typen. Vor und nach jedem fraglichen Serum wurde ein Standard M1 oder M2 aufgetragen, so konnten die Banden je nach Lage und Breite im Vergleich zu den Standardseren den jeweiligen Typen zugeordnet werden.

Bei Seren vom heterozygoten Typ MS war die S-Bande relativ einfach zu erkennen. Zur Unterscheidung der M-Untertypen wurde nach obigem Schema vorgegangen. Fragliche MZ Seren wurden im Vergleich mit einem Z Standard abgelesen, um lagerungsbedingte Artefakte auszuschließen.

Außer M, S und Z, sowohl homozygot als auch heterozygot, wurden bei den Münchner Seren keine anderen Pi-Untergruppen gefunden. In der Marburger Stichprobe konnten zwei seltene Phänotypen klassifiziert werden, die M1P und LM1 zuzuordnen waren.



Abb. 3

M1M2 M3M2 M1M1 M1M3 M3M2 M1M1 M1M2

Die Doppelbande der Heterozygoten M1M2 ist deutlich sichtbar, die M1M3-Banden sind unschärfer und breiter als die der homozygoten Typen M1M1 beziehungsweise M3M3. Der heterozygote Typ M3M2 zeigt eine Aufspaltung in zwei Banden. M3 liegt nicht genau in der Mitte zwischen M1 und M2, sondern weiter anodal, näher bei M1.

Abb. 4

M1M2 SS M2S M1M1



Der homozygote Typ SS zeigt in Höhe der M4-Bande keine vergleichbare Struktur. Die S4-Bande liegt wesentlich tiefer und darf nicht mit der M6-Bande verwechselt werden. Die S6-Bande liegt unterhalb der M7-Bande. (Nomenklatur: 14) Die Doppelbande M2S ist deutlich weiter auseinandergezogen als die von M1M2.

Tabelle 1

Pi-Phänotypen	München		Marburg	
	n	%	n	%
M1	147	56,2	63	43,2
M1M3	33	12,5	23	15,8
M1M2	60	23,0	37	25,3
M3	1	0,4	2	1,4
M3M2	6	2,3	4	2,7
M2	2	0,8	2	1,4
M1S	10	4,0	7	4,8
M3S	-	-	1	0,7
M2S	1	0,4	-	-
S	-	-	1	0,7
M1Z	-	-	4	2,7
M2Z	1	0,4	-	-
M1P	-	-	1	0,7
LM1	-	-	1	0,7
n	261		146	

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Pi-Phänotypen der Eltern-
generation in den Familien aus Marburg und München einschließ-
lich der Mütter der Mutter-Kind Paare aus München.

Tabelle 2

	München	Marburg
Pi-Allele		
Pi ^{M1}	0,7623	0,6815
Pi ^{M3}	0,0777	0,1096
Pi ^{M2}	0,1364	0,1541
Pi ^S	0,0208	0,0342
Pi ^Z	0,0019	0,0137
Pi ^x	0	0,0068

Pi^x steht für die Häufigkeit von seltenen Pi-Allelen.

Tabelle 2 zeigt die Verteilung der Pi-Allele der Elterngene-
ration in den Familien aus München und Marburg sowie der Müt-
ter der Mutter-Kind Paare aus München.

Schwierigkeiten bei der Klassifizierung der Pi-Untergruppen

Alle Gele wurden von zwei, beziehungsweise drei Personen un-
abhängig voneinander abgelesen. Bei übereinstimmenden Ergebnis-
sen wurde die Serumprobe als endgültig klassifiziert einge-
ordnet. Bei Differenzen wurden Wiederholungsuntersuchungen
vorgenommen.

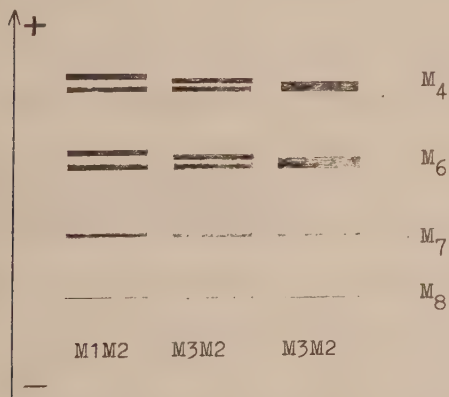
In einem Fall wurde das Serum der Mutter eines Kindes mit dem
homozygoten Typ SS als M1M1 homozygot klassifiziert. Eine Wie-
derholung brachte das gleiche Ergebnis. Erst eine Fokussierung

der doppelten Menge Serum bei einem pH-Wert von 3,5 - 10,0 zeigte auch bei der Mutter eine schwache S-Bande zusätzlich zur M1-Bande.

Schwierigkeiten traten auch bei der Identifizierung von Pi MZ-Seren auf, da die Z-Banden, wie mehrfach beobachtet wurde, nach mehrmaligem Auftauen der Seren ganz verschwinden können. Es ist nicht eindeutig auszuschließen, daß ein MZ-Serum fälschlicherweise als MM gedeutet worden ist.

Bei der Auftrennung des M-Untertypen M3M2 wurden Unterschiede beobachtet. Zum Teil zeigten sich Doppelbandenmuster aus M2 und M3, welche eindeutig von solchen aus M1 und M2 zu unterscheiden waren, und damit eine eindeutige Klssifizierung erlaubten. Zum Teil fanden sich Muster mit einer verbreiteten, unscharf abgrenzbaren Einfachbande.

Abb. 5



Schematische Darstellung der unterschiedlichen Auftrennung von M3M2.

Änderung einiger methodischer Faktoren

Um diesen Klassifizierungsschwierigkeiten zubegegnen und eine Verbesserung der Methode zu erreichen, wurden in der Herstellung der Gele und bei der Ausführung der Fokussierung verschiedene Faktoren geändert.

Polymerisation der Gele

Die Polymerisation wurde zum Teil chemisch mit Ammoniumpersulfat 1 %ig durchgeführt, zum Teil photochemisch mit Riboflavin und UV-Licht. Beide Methoden zeigten Vor- und Nachteile. Die besten Ergebnisse lieferte eine Mischung aus 0,1 ml Riboflavin und 0,8 ml Ammoniumpersulfat 1 %ig, wobei die Polymerisation unter UV-Bestrahlung nach 30 Minuten abgeschlossen war. Das Arbeiten mit Ammoniumpersulfat erforderte schnelles Handeln, da das flüssige Gel schon während dem Einfüllen fest werden konnte. Der Vorteil dieser Polymerisationsmethode bestand in einer breiten Spaltung der Doppelbanden der M1M2 Typen nach der Fokussierung. Die Seren wanderten nicht so weit anodenwärts, so daß nur die Banden M4, M6 und M7 ablesbar waren. Dies zeigte sich als Nachteil bei der Klassifizierung der Z- und S-Banden, da diese fast nicht mehr zu erkennen waren. Die Polymerisation mit Riboflavin und UV-Licht dauerte eine Stunde. Die Seren wanderten weiter anodenwärts, S- und Z-Banden waren deutlich zu erkennen, während die Unterscheidung der M-Untergruppen fast unmöglich war.

Abb. 6



Abb. 7



Abb. 8



M2M2 M2M3 M1M2 M1M3 M3M2 M1M2

Abbildung 6, 7 und 8 geben ein Beispiel für die unterschiedliche Trennschärfe bei den verschiedenen Polymerisationsmöglichkeiten. Bei Abbildung 6 und 7 handelt es sich um Polymerisation mit Riboflavin und UV-Licht. Auf Bild 6 sind die S-Banden, auf Bild 7 die Z-Banden gut zu erkennen. Hingegen sind die M-Untergruppen nicht zu klassifizieren. Bei Abbildung 8 handelt

es sich um Polymerisation mit Ammoniumpersulfat 1 %ig. Das Doppelbandenmuster M1M2 tritt klar hervor, während ein Pi MZ oder Pi MS nicht eindeutig auszuschließen ist.

Lagerung der fertig gegossenen Gele

Fertige Gele, welche über Nacht im Eisschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, zeigten bessere Ergebnisse als solche, die nur eine halbe Stunde vor Auftragen der Seren gekühlt wurden. Gele, die älter als 24 Stunden waren, lieferten eindeutig schlechtere Ergebnisse, auch wenn sie im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Eine halbstündige Vorfokussierung vor dem Auftragen der Seren lieferte nach Genz et al. (23) keine besseren Ergebnisse und wurde deshalb bei diesen Untersuchungen nicht durchgeführt.

Temperaturänderung während der Fokussierung

Um eine optimale Auftrennung der Seren zu erreichen, mußte die Temperatur der Gele während der gesamten Fokussierung exakt bei $+11^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Versuche zeigten, daß die Toleranz gegenüber Temperaturschwankungen sehr gering ist. Schon eine Abweichung von $\pm 1,5 - 2,0^{\circ}\text{C}$ brachte eine schlechtere Auftrennung der Seren mit sich.

Veränderung der Dauer der Fokussierung

Eine Verlängerung oder eine Verkürzung der dreistündigen Laufzeit um 15 Minuten zeigte keine Änderung in der Auftrennung. Bei Laufzeiten unter zwei Stunden 45 Minuten war die Fokussierung noch nicht abgeschlossen, die Banden blieben ver-

schwommen. Längere Laufzeiten brachten keine Verbesserung mit sich.

Die Vererbung der Pi M-Untergruppen

Es wird angenommen (22), daß die sechs Pi M-Untergruppen durch drei Allele Pi^{M1} , Pi^{M3} und Pi^{M2} codiert werden, die sich zu den bisher bekannten Pi-Allelen kodominant verhalten. In einer Studie von 145 Mutter-Kind Paaren und 58 Familien mit insgesamt 69 Kindern aus München, sowie 73 Familien mit 132 Kindern aus Marburg wurde versucht, diese Hypothese zu bestätigen.

Tabelle 3

Mütter	n	Kinder								n
		M1M1	M1M3	M3M3	M1M2	M3M2	M2M2	M1S	M2S	
M1M1	80	60	6		13			1		80
M1M3	20	12	2	3	1	2		0		20
M1M2	34	9	2		17	2	4	0	0	34
M3M2	3		2	0	1	0	0		0	3
M1S	7	3	0		0			3	1	7
M2Z	1				1	0	0		0	1
	145	84	12	3	33	4	4	4	1	145

Verteilung der Pi M-Untergruppen in Serien von 145 Mutter-Kind Paaren. 0 bedeutet in den Tabellen, daß diese Konstellation möglich ist, aber in dem untersuchten Material nicht vorkam.

Tab. 4b

Eltern	n	Kinder											n
		M1M1	M1M3	M1M2	M3M2	M1S	M2S	M3S	SS	M1Z	IM1	IM2	M1P
M1M1 x M1S	4	4				4							8
M1M1 x M2S	1			2		2							4
M1M1 x SS	1					2							2
M1M1 x M1Z	4	4								4			8
M1M3 x M1S	2	1	0			0		1					2
M1M2 x M1S	2	0		1		0	1						2
M1M2 x M3S	1		0		0	2	0						2
M1M2 x IM1	1	0		0							1	1	2
M1M2 x M1P	1	1		0									1
M1S x M1S	1	0				0			1				1
	18	10		3		10	1	1	1	4	1	1	33

Aufteilung einiger seltener Pl-Phänotypen in einem Kollektiv von 131 Familien mit insgesamt 201 Kindern.

Tabelle 4a

Eltern	n	Kinder						
		M1M1	M1M3	M3M3	M1M2	M3M2	M2M2	
M1M1 x M1M1	34	47						47
M1M1 x M1M3	18	17	15					32
M1M1 x M3M3	2		2					2
M1M1 x M1M2	27	20			15			35
M1M1 x M3M2	3		0		3			3
M1M1 x M2M2	2				2			2
M1M3 x M1M3	3	1	2	2				5
M1M3 x M1M2	9	7	6		2	2		17
M1M3 x M3M2	1		0	0	1	0		1
M1M2 x M1M2	8	4			3		4	11
M1M2 x M3M3	1		1			1		2
M1M2 x M3M2	3		3		1	3	1	8
M1M2 x M2M2	2				2		1	3
113 Familien								168 Kinder

Aufteilung der Pi M-Untergruppen in einem Kollektiv von 131 Familien mit insgesamt 201 Kindern.

Diskussion

Sowohl die Genfrequenzen der Pi M-Allele als auch die Verteilung der Pi M-Untergruppen in den Stichproben von München und von Marburg zeigen eine gute Übereinstimmung mit den bisherigen Untersuchungen in Mitteleuropa und der weißen Bevölkerung in Amerika (19, 22, 36). Die Ergebnisse anderer Untersucher an Bevölkerungsgruppen aus Amerika und Westafrika stimmen untereinander gut überein. Negrider haben aber im Gegensatz zu den Europiden höhere Werte für M1 und entsprechend erniedrigte Werte für M2 und M3.

Die Häufigkeit des Pi^S-Allels in den beiden von uns untersuchten Stichproben stimmt ebenfalls gut mit den bisherigen Untersuchungen überein. Die Genfrequenz für das Allel Pi^Z liegt in München und Marburg unter den Werten der anderen Autoren. Ob es sich hierbei um einen Zufall handelt, oder ob es die wiederholt beschriebene unterschiedliche Verteilung der Pi-Phänotypen in den einzelnen Gebieten Europas wiedergibt müßte in einer umfassenderen Studie untersucht werden (7, 11, 12, 16). Es ist auch nicht auszuschließen, daß einzelne Pi Z-Seren fälschlicherweise als Pi M identifiziert worden sind. Dies mag auf dem beschriebenen Verhalten der Z-Bande nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen beruhen. Es wurde gezeigt, daß dies bei dem heterozygoten Typ Pi MZ zu einem Verschwinden der Z-Bande führt und somit der Phänotyp eines homozygoten Pi MM erzeugt wird.

Tabelle 5 und 6 fassen die bisherigen zur Populationsgenetik der Pi M-Untergruppen vorliegenden Untersuchungsergebnisse zusammen (19, 22, 36).

	n	M1M1	M1M2	M1M3	M2M2	M3M2	M3M3	M1S	M2S	M3S	M1Z	M2Z	M3Z	x
Finnland	136	62,5	13,2	16,9	-	2,9	2,2	-	-	-	2,2	-	-	-
Holland	131	58,0	16,8	6,9	3,1	1,5	0,8	6,9	0,8	-	3,1	0,8	0,8	0,8
Mali/Westafrika	102	87,3	4,9	6,9	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
Amerika/weiß	240	41,0	21,3	16,0	5,8	-	0,8	5,0	-	-	2,5	-	-	0,4
Amerika/schwarz	304	81,6	4,9	9,5	-	-	0,3	1,0	-	-	0,7	-	-	1,0
Deutsche/München	538	58,2	20,6	7,4	2,0	3,5	0,6	2,6	0,7	0,4	2,0	0,4	-	4,6
<u>eigene Untersuchung</u>														
München	261	56,2	23,0	12,5	0,8	2,3	0,4	4,0	0,4	-	-	0,4	-	-
Marburg	146	43,2	25,3	15,8	1,4	2,7	1,4	4,8	-	0,7	2,7	-	-	2,1

	M1	M2	M3	S	Z	x
Finnland	0,79	0,08	0,12	-	0,01	-
Holland	0,75	0,13	0,05	0,04	0,03	-
Mali/Westafrika	0,93	0,02	0,04	-	0,01	-
Amerika/weiß	0,64	0,19	0,11	0,04	0,01	0,01
Amerika/schwarz	0,90	0,03	0,05	0,01	0,01	-
Deutsche/München	0,75	0,15	0,06	0,02	0,01	0,01
<u>eigene Untersuchung</u>						
München	0,76	0,14	0,08	0,02	0,01	-
Marburg	0,68	0,15	0,11	0,03	0,01	0,01

x steht für seltene Pi-Allele.

Die beschriebenen Unterschiede bei den Pi M³M² Typen lassen die Vermutung zu, daß das Allel Pi^{M³} nochmals unterteilt werden kann. Einige M³M² Seren zeigten nach der Fokussierung eine enge Doppelbande, die klar von dem Doppelbandenmuster der M¹M² Typen zu unterscheiden war. Andere Seren vom gleichen Typ zeigten eine breite, unscharf begrenzte Einfachbande. Bei der geringen Anzahl der M³M² Seren im untersuchten Material konnte diese Unterteilung zahlenmäßig nicht eindeutig belegt werden. Die postulierte Variante könnte mit Pi M_{Montreal} identisch sein (23).

Bei allen 148 Familien und 145 Mutter-Kind Paaren zeigte sich für die Pi M-Untergruppen keine Abweichung vom postulierten Erbgang. Danach werden die sechs Pi M-Untergruppen durch drei Allele Pi^{M¹}, Pi^{M³} und Pi^{M²} codiert, und verhalten sich zu den übrigen bisher bekannten Pi-Untertypen kodominant. Da in dieser Studie bei den Elternpaaren nicht alle Konstellationsmög-

lichkeiten vorkamen, können die Ergebnisse dieser Untersuchung zwar als Bestätigung der Hypothese, aber nicht als Beweis angesehen werden. Auch wurden in einigen Familien nicht alle Konstellationsmöglichkeiten der elterlichen Allele durch vorhandene Kinder bestätigt, was in den Tabellen durch 0 ausgedrückt worden ist.

Die Frage, ob die Bestimmung der Pi-Untergruppen im Serum mit in die Vaterschaftsbegutachtung sich einbeziehen läßt, kann nicht eindeutig beantwortet werden.

Nimmt man für das Allel Pi^{M1} eine Häufigkeit von 0,7623 und für Pi^{M3} 0,0777 und für Pi^{M2} 0,1634, so ergibt die Berechnung der theoretischen Ausschlußwahrscheinlichkeit für Nichtväter einen Wert von 20,05 %. Dieser Wert liegt etwa in der Größenordnung wie diejenigen für die Blutgruppensysteme Duffy = 18,37 % und Kidd = 18,74 %. Die Ausschlußchance für die meisten anderen Untersuchungen liegt darunter und nur für wenige darüber, wie zum Beispiel für das Rhesussystem = 26,73 %.

Die Verwendung des Pi-Systems in der Vaterschaftsdiagnostik setzt jedoch voraus, daß die einzelnen Pi M-Untergruppen und die übrigen bisher vorkommenden Pi-Typen eindeutig klassifizierbar sein müssen. Bei der Auswertung der Ergebnisse der Isoelektrofokussierung gibt es jedoch noch einige Schwierigkeiten:

1. In einem Fall war die S-Bande so schwach, daß sie mit der herkömmlichen Methode nicht identifiziert werden konnte. Erst bei der Fokussierung der doppelten Menge Serum bei einem anderen pH-Gradienten zeigte sich die S-Bande.
2. Da bei der Vaterschaftsbegutachtung die Seren für die verschiedenen Untersuchungen häufig mehrmals eingefroren und

aufgetaut werden, besteht für die Seren mit dem heterozygoten Typ Pi MZ die Gefahr, als homozygot Pi MM klassifiziert zu werden.

3. Die fragliche weitere Unterteilung des Allels Pi^{M3} bringt auch Unklarheiten mit sich, hauptsächlich in der Beurteilung der Heterozygoten M1M3 und M3M2,

Da für die Vaterschaftsbegutachtung die möglichen Ausschlusskonstellationen eindeutig zu klassifizieren sein müssen, erscheint die Verwendung der Pi M-Untergruppen noch problematisch. Vermutlich können Änderungen sowohl in der Herstellung der Gele als auch in der Ausführung der Fokussierung die erforderliche Sicherheit in der Typisierung der Pi M-Untergruppen gewährleisten.

In jüngster Zeit ist die Frage einer Beziehung zwischen den Pi M-Untergruppen und einer Disposition zur Entwicklung einer obstruktiven Lungenerkrankung aufgeworfen worden (4, 23). Genz (23) untersuchte eine Stichprobe von 33 Kindern mit spastischen Bronchitiden. In dieser Stichprobe war die Aufteilung der Pi M-Untergruppen die gleiche wie in einer Kontrollgruppe von gesunden Blutspendern. Bencze (4) untersuchte 76 erwachsene Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und fand erhebliche Unterschiede zur Verteilung der Pi M-Untergruppen in einer Kontrollgruppe von 331 gesunden Probanden. Der Phänotyp M1M1 erreichte bei Gesunden 60 %, während bei Emphysematikern nur knapp 20 % diese Untergruppe aufwiesen. Die Untergruppen M3M3, M1M3 und M3M2 ergaben bei Gesunden weniger als 20 %, bei Kranken 50 %. Individuen mit dem Allel Pi^{M3}, und zwar sowohl Homozygote als auch Heterozygote, waren nach den Ergebnissen dieser Studie eher disponiert, an Emphysem zu erkranken. Für die Gruppen M2M2 und

M1M2 ergaben sich für Gesunde und Kranke gleiche Werte. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß die F₁L-Untergruppenbestimmung für die klinische Genetik von Bedeutung sein könnte.

Zusammenfassung

Zur Bestätigung des postulierten kodominanten Erbganges der Pi M-Untergruppen wurden mittels Isoelektrofokussierung die Pi M-Typen in den Seren von 145 Mutter-Kind Paaren sowie von 58 Familien mit 69 Kindern untersucht. Es fand sich in keinem Fall eine Abweichung davon, sodaß angenommen werden kann, daß die sechs Pi M-Untergruppen durch drei Allele Pi^{M1} , Pi^{M3} und Pi^{M2} bestimmt werden. Diese verhalten sich untereinander und zu den bisher bekannten Pi-Varianten kodominant.

Für diese drei Allele wurde in der Elterngeneration eine Genfrequenz von 0,76 für Pi^{M1} , 0,08 für Pi^{M3} und 0,14 für Pi^{M2} gefunden. Diese Werte stimmen gut mit den bisherigen Untersuchungen über die Pi M-Untergruppenverteilung überein.

Aufgrund der unterschiedlichen Auftrennung der Heterozygoten Pi^{M3M2} wurde die Möglichkeit einer weiteren Unterteilung des Allels Pi^{M3} erwogen.

Um eine optimale Auftrennung der Seren zu erreichen, wurden einige Faktoren bei der Isoelektrofokussierung verändert: die Polymerisation und Lagerung der Gele, die Dauer der Fokussierung und die Temperatur während der Auftrennung.

Überlegungen über das Einbeziehen der Pi M-Untreguppenbestimmung in die Vaterschaftsdiagnostik führten zu einem negativen Ergebnis, während für die klinische Genetik diese Bestimmung von Bedeutung sein könnte.

Literatur

1. Allen, R. C., Harley, R. A., Talamo, R.C.
New method for determination of α_1 -antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrylamide gel slabs.
Amer. J. Clin. Path. 62: 732-739 (1974).
2. Arnaud, C., Chapuis-Cellier, C., Creyssel, R.
The Pi system: Its study by means of thin-layer-gel-electrofocusing in polyacrylamide gel.
In: Protides of Biological Fluids, 22nd Colloquium 1974 (H. Feeters, ed.): 515-520
Oxford, Pergamon Press (1975).
3. Bell, O., Carrell, R. W.
Basis of the defect in α_1 -antitrypsin deficiency.
Nature 234: 410-411 (1973).
4. Bencze, K.
Elektrophoreseforum München, 25.10.-27.10.1978
Herausgeber: Radola, B. J. 7-13
Phänotyp MM des α_1 -Antitrypsins, Auftrennung, Identifizierung und Bedeutung der Nebengruppen bei Lungenerkrankungen.
5. Blundell, G., Cole, R. B., Nevin, N. C., Bradley, B.
 α_1 -antitrypsin null gene (Pi⁻).
Lancet 2: 404 (1974)
6. Blundell, G., Frazer, A., Cole, R. B., Nevin, N. C.
 α_1 -antitrypsin phenotypes in Northern Ireland.
Ann. Hum. Genet. 38: 289-294 (1975)
7. Cleve, H., Patutschnik, W., Strecker, K., Nevo, S.

Inheritance of Pi M subtypes.

A study of 151 families with a total of 242 children and 142 mother-child pairs.

Human Heridity, zur Veröffentlichung angenommen.

8. Cook, P. J. L.
The genetics of α_1 -antitrypsin: A family study in England and Scotland.
Ann. Hum. Genet. 38: 275-287 (1975)
9. Cox, D. W.
A new deficiency allele of α_1 -antitrypsin: Pi M_{Malton} .
In: Protides of Biological Fluids, 23rd Colloquium 1975 (H. Peeters, ed.): 375-378
Oxford Pergamon Press (1976)
10. Eriksson, S.
Pulmonary emphysema and α_1 -antitrypsin deficiency.
Acta Med. Scand. 175: 197-205 (1964)
11. Eriksson, S.
Studies in α_1 -antitrypsin deficiency.
Acta Med. Scand. 175, Suppl. 432: 1-85 (1965)
12. Fagerhol, M. K.
Serum Pi types in Norwegians.
Acta Path. Microbiol. Scand. 70: 421-428 (1967)
13. Fagerhol, M. K.
Genetics of the Pi system.
In: Pulmonary Emphysema and Proteolysis (C. Mittman) 123-131 New York, Academic (1972)
14. Fagerhol, M. K.
Acid Starch Gel Electrophoresis for Detection of α_1 -antitrypsin Variants (Pi Types): Outline of Techniques

Employed Currently.

In: Pulmonary Emphysema and Proteolysis (C. Mittman)
145-149

New York, Academic (1972)

15. Fagerhol, M. K.

Pi-typing techniques.

In: Protides and Biological Fluids, 22nd Colloquium
1974 (H. Peeters, ed.): 493-495.

Oxford, Pergamon Press (1975)

16. Fagerhol, M. K., Eriksson, A. W., Mohn, E.

Serum Pi types in some Lappish and Finnish population.
Human Heridity 19: 360-364 (1969)

17. Fagerhol, M. K., Laurell, C. B.

The polymorphism of prealbumin and α_1 -antitrypsin in
human sera.

Clin. Chem. Acta 16: 199-203 (1967)

18. Fagerhol, M. K., Laurell, C. B.

The Pi-system, inherited variants of α_1 -antitrypsin.
In: Progress in medical genetics (A. G. Steinberg,
A. G. Bearn, eds.)

Vol 7: 96-111

New York, Grune and Stratton (1970)

19. Frants, R. R., Eriksson, A. W.

Reliable Classification of 6 Pi^M Subtypes by Seperator
Isoelectric Focusing.

Human Heridity 28: 201-209 (1978)

20. Frants, R. R., Eriksson, A. W., Noordhoek, G. T.

Studies on a new common α_1 -antitrypsin variant.

17th Dutch Fed. Meet. (1976)

21. Ganrot, P. O., Bjerre, B.
 α_1 -antitrypsin and α_1 -macroglobulin concentration during pregnancy.
Acta Obstet, Gynecol. Scand. 46: 126-137 (1967)
22. Genz, Th., Martin, J. P., Cleve, H.
Classification of α_1 -antitrypsin Pi phenotypes by isoelectrofocusing. Distinction of six subtypes of the Pi M phenotype.
Hum. Genet. 38: 325-333 (1977)
23. Genz, Th.
Untersuchungen zur Verteilung der erblichen α_1 -Antitrypsin Pi Typen.
Dissertation, Medizin LMU München 1978
24. Jeppsson, J. O., Laurell, C. B.
Structure of α_1 -antitrypsin.
Clin. Chem. Acta 103-107 (1975)
25. Johnson, A. M.
Genetic typing of α_1 -antitrypsin by immunofixation electrophoresis. Identification of subtypes of Pi^M.
J. Lab. Clin. Med. 87: 152-163 (1976)
26. Johnson, A. M., Alper, C. A.
Deficiency of α_1 -antitrypsin in childhood liver disease.
Pediatrics 46: 921-925 (1970)
27. Johnson, D. A., Travis, J.
Mechanism and Structure of Human Protease Inhibitor.
Protides of Biological Fluids, 22nd Coll. 1974
(H. Peeters ed.) 35-38 (1975)

28. Johnson, A. M.
Pi-workshop, Rouen, France, July 1978
Personal Communication by A. M. Johnson.
29. Kellermann, G., Walter, H.
Investigations on the Population Genetics of the α_1 -
antitrypsin Polymorphism.
Humangenetik 10: 145-150 (1970)
30. Klasen, E. C., Bogaart, A. M., Bernini, L. F.
Chemical Properties of α_1 -antitrypsin.
In: Protides of Biological Fluids, 22nd Coll. 1974
(H. Peeters, ed.): 511-514
Oxford, Pergamon Press (1975)
31. Klasen, E. C., Franken, C., Volkers, W., Bernini, L.
Population Genetics of α_1 -antitrypsin in the Netherland.
Descriptions of a New Electrophoretic Variant.
Hum. Genet. 37: 303-313 (1977)
32. Küppers, F.
Genetically determined differences in the response
of α_1 -antitrypsin levels in the human serum to typhoid
vaccine.
Humangenetik 6: 207-214 (1968)
33. Küppers, F.
 α_1 -antitrypsin: Physiology, Genetics and Pathology.
Humangenetik 11: 177-189 (1971)
34. Küppers, F.
Determination of α_1 -antitrypsin phenotypes by isoelec-
tric focusing in polyacrylamide gels.
J. Lab. Clin. Med. 88/1: 151-155 (1976)

35. Küppers, F.
 α_1 -antitrypsin M₁: A new common genetically determined variant.
Am. J. Hum. Genet. 28: 370-377 (1976)
36. Küppers, F., Christopherson, M. J.
 α_1 -antotrypsin: Further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing.
Am. J. Hum. Genet. 29: 65a (1977)
37. Laurell, C. B., Sveger, T., Unjunggren, C. B.
 α_1 -antitrypsin deficiency Pi genotypes ZO, SO and MO.
Acta Paed. Scand. 63: 855-857 (1974)
38. Laurell, C. B., Eriksson, A. W.
The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency.
Scand. J. Clin. Lab. 15: 132-140 (1963)
39. Lebas, J.
Two dimensional immunoelectrofocusing for studying genetic polymorphism of α_1 -antitrypsin.
LKB application note No. 152 (1974)
40. Liebermann, J., Gaidulis, L.
Simplified α_1 -antitrypsin phenotyping by immunofixation of acid starch gels.
J. Lab. Clin. Med. 87/4: 710-715 (1976)
41. Liebermann, J., Gaidulis, L., Klotz, S. D.
A new Deficient Variant of α_1 -antitrypsin (M_{Duarte}).
Am. Rev. Resp. Dis. 113: 31-36 (1976)
42. Liebermann, J., Mittman, C., Schneider, A. S.
Screening for homozygous and heterozygous α_1 -anti-

trypsin deficiency. Protein electrophoresis on cellulose acetate membranes.

JAMA 210: 2055-2060 (1969)

43. Liebermann, J., Mittman, C., Kent, J. R.

Screening for homozygous and heterozygous α_1 -antitrypsin deficiency. A provocative test with diethylstilbestrol and effect of oral contraceptiva.

JAMA 217: 1198-1206 (1971)

44. Martin, J. P., Ropartz, C.

Le déficit en α_1 -antitrypsine et l'allèle Pi^{nul} .

Rev. Franc. Transf. 18: 27-45 (1975)

45. Martin, J. P., Vandeville, D., Ropartz, C.

α_1 -antitrypsin deficiency: Pi^0 .

Lancet 2: 845 (1973)

46. Mittman, J., Liebermann, J., Marasso, F., Miranda, A.

Smoking and chronic obstructive lung disease in α_1 -antitrypsin deficiency.

Chest 60: 214-221 (1971)

47. Mittman, C., Liebermann, J., Rumsfeld, J.

Prevalence of abnormal protease inhibitor phenotypes in patients with chron. obstr. lung disease.

Am. Rev. Resp. Dis. 109: 295-296 (1974)

48. Ohlson, K.

Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma α_1 -antitrypsin.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28: 251-253 (1971)

49. Porter, C. A., Mowat, A. P., Cook, P., Haynes, D.W.

Shilkin, K. B., Williams, R.

α_1 -antitrypsin deficiency and neonatal hepatitis.

Brit. Med. J. 3: 435-439 (1972)

50. Prokop, O.
Die menschlichen Blut- und Serumgruppen.
(1971) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
51. Schultze, H. E., Göllner, J., Heide, K. K., Schönenberger, K., Schwick, G.
Zur Kenntnis der α_1 -Globuline des menschlichen Normalserums.
Z. Naturforsch. 10 b: 463-473 (1955)
52. Sharp, H. L., Bridges, R. A., Krivit, A., Freier, E.
Cirrhosis associated with α_1 -antitrypsin deficiency:
a previous unrecognized disorder.
J. Lab. Clin. Med. 73: 934-939 (1969)

Lebenslauf

- 17.8.1948 als drittes von vier Kindern des praktischen Arz-
tes Dr. med Hans Kretschmer und seiner Ehefrau Ur-
sula, geb. Eickhoff, in Fürstenfeldbruck geboren
- 1954 katholische Mädchenschule, Fürstenfeldbruck
- 1958 math. nat. Gymnasium, Fürstenfeldbruck
- 1964 musikalisches Gymnasium der Dominikanerinnen, Wetten-
hausen/Schwaben
- 1966 Lehranstalt für med. techn. Assistentin , Ph. Walner,
München
- 1968 Staatsexamen als med. techn. Assistentin
- 1968 klin. chem. Labor und Röntgendiagnostik, Kreiskran-
kenhaus Fürstenfeldbruck
- 1970 Röntgendiagnostik, Universitätsklinik Basel
- 1971 tierexperimentelle radiologische Abteilung, Univer-
sitätsklinik Zürich
- 1972 Röntgendiagnostik, Kreiskrankenhaus München-Pasing
- 1972 Abendschule zur Vorbereitung für das Begabtenabitur
- 1974 Eheschließung mit dem Arzt Wolf Strecker
- 1975 Begabtenabitur im Fach Medizin, München
- 1975 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universi-
tät München
- 1979 Geburt einer Tochter Lisa Verena
- 1981 Approbation als Arzt

